

## **METHOD OF PROTECTING SINGLE-PHASE DISTRIBUTION LINE FROM LIGHTNING DAMAGE**

Publication number: JP2004266900

**Publication date:** 2004-09-24

**Inventor:** SUGIMOTO HITOSHI; ASAOKA YOSHINOBU;  
NAKADA KAZUO

**Applicant:** HOKURIKU ELECTRIC POWER

### Classification:

**- international:** **H02H9/06; H02G7/00; H02G13/00; H02H9/06;**  
**H02G7/00; H02G13/00;** (IPC1-7): H02H9/06; H02G7/00;  
H02G13/00

- European:

**Application number:** JP20030052785 20030228

**Priority number(s):** JP20030052785 20030228

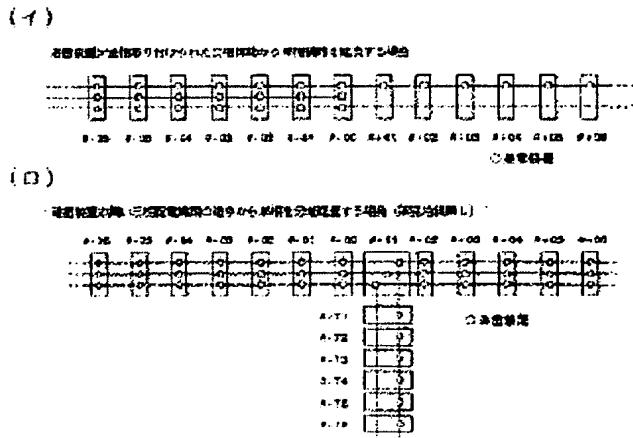
### **Report a data error here**

## Abstract of JP2004266900

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To provide a method of protecting a single-phase distribution line from thunder, which enables omission of attaching a lightning protector, while maintaining low thunder short-circuit damage rate.

**SOLUTION:** This method omits attachment of lightning protectors to only one phase provided for all utility poles, in the single-phase distribution line which is constituted by drawing out two phases from a three-phase distribution line, where lightning protectors are attached to all phases as regards all utility poles.

COPYRIGHT: (C)2004, JPO&NCIPI



Data supplied from the [esp@cenet](mailto:esp@cenet) database - Worldwide

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平4-266900

(43)公開日 平成4年(1992)9月22日

(51)Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 07 K 15/08		7731-4H		
A 61 K 37/02	ADZ	8314-4C		
C 07 K 3/02				
7/08	ZNA	8318-4H 8828-4B	C 12 N 15/00	A

審査請求 未請求 請求項の数8(全9頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平3-49261

(22)出願日 平成3年(1991)2月21日

(71)出願人 000216162

天野製薬株式会社

愛知県名古屋市中区錦1丁目2番7号

(72)発明者 名取 俊二

茨城県北相馬郡利根町布川2208-19

(54)【発明の名称】 新規生理活性蛋白、その製造法および用途

(57)【要約】

【目的】 センチニクバエ幼虫の体液中に存在する新規生理活性蛋白を提供する。本発明の新規生理活性蛋白は真菌類に対して強い抗菌作用を有する。

【構成】 センチニクバエ幼虫体液中に存在する新規な生理活性蛋白は、11種類のアミノ酸よりなる蛋白であり、グリシンとヒスチジンがモル比でそれぞれ30%及び20%を占める偏ったアミノ酸組成を持つ。この蛋白とザルコトキシンI及び/又はザーベシンと併用することによって抗真菌作用が著しく増大する。本発明はこの蛋白及びその製造法さらにはそれを用いた抗真菌剤に関する。

Applicants: Peter David East and Susan Elizabeth Brown  
U.S. Serial No.: 10/590,539  
Filed: as §371 national stage of  
PCT/AU2005/000234  
Exhibit 26

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 双翅目または膜翅目に属する昆虫の幼虫  
体液中に存在し、下記の性質を有する生理活性蛋白。 \* (1) 分子量約13,000  
(2) 热安定性(5~10分間、100℃)  
(3) アミノ酸組成(モル%)

グリシン	約 30. 93
ヒスチジン	約 20. 05
グルタミン酸またはグルタミン	約 17. 51
アスパラギン酸またはアスパラギン	約 10. 75
チロシン	約 7. 13
アラニン	約 3. 49
バリン	約 3. 01
リジン	約 2. 92
ロイシン	約 1. 55
アルギニン	約 1. 44
セリン	約 1. 23

【請求項2】 配列表の配列番号：1に記載するアミノ酸配列で示される生理活性蛋白。

※とを特徴とする生理活性蛋白の製造法。

(1) 分子量約13,000

(2) 热安定性(5~10分間、100℃)

(3) アミノ酸組成(モル%)

グリシン	約 30. 93
ヒスチジン	約 20. 05
グルタミン酸またはグルタミン	約 17. 51
アスパラギン酸またはアスパラギン	約 10. 75
チロシン	約 7. 13
アラニン	約 3. 49
バリン	約 3. 01
リジン	約 2. 92
ロイシン	約 1. 55
アルギニン	約 1. 44
セリン	約 1. 23

【請求項3】 双翅目または膜翅目に属する昆虫の幼虫  
体液より下記の性質を有する生理活性蛋白を取得するこ※

※とを特徴とする生理活性蛋白の製造法。

(1) 分子量約13,000

(2) 热安定性(5~10分間、100℃)

(3) アミノ酸組成(モル%)

グリシン	約 30. 93
ヒスチジン	約 20. 05
グルタミン酸またはグルタミン	約 17. 51
アスパラギン酸またはアスパラギン	約 10. 75
チロシン	約 7. 13
アラニン	約 3. 49
バリン	約 3. 01
リジン	約 2. 92
ロイシン	約 1. 55
アルギニン	約 1. 44
セリン	約 1. 23

【請求項4】 双翅目または膜翅目に属する昆虫の幼虫  
体液より配列表の配列番号：1に記載するアミノ酸配列  
で示される生理活性蛋白を取得することを特徴とする生  
理活性蛋白の製造法。

30★体液中に存在し、下記の性質を有する生理活性蛋白を含  
有してなる抗真菌剤。

(1) 分子量約13,000

(2) 热安定性(5~10分間、100℃)

(3) アミノ酸組成(モル%)

【請求項5】 双翅目または膜翅目に属する昆虫の幼虫★

グリシン	約 30. 93
ヒスチジン	約 20. 05
グルタミン酸またはグルタミン	約 17. 51
アスパラギン酸またはアスパラギン	約 10. 75
チロシン	約 7. 13
アラニン	約 3. 49
バリン	約 3. 01
リジン	約 2. 92
ロイシン	約 1. 55
アルギニン	約 1. 44
セリン	約 1. 23

【請求項6】 配列表の配列番号：1に記載したアミノ  
酸配列で示される生理活性蛋白を含有してなる抗真菌  
剤。

にザルコトキシンおよび/又はザーベシンを含有してな  
る抗真菌剤。

(1) 分子量約13,000

(2) 热安定性(5~10分間、100℃)

(3) アミノ酸組成(モル%)

【請求項7】 双翅目または膜翅目に属する昆虫の幼虫  
体液中に存在し、下記の性質を有する生理活性蛋白並び

3

グリシン	約 30. 93
ヒスチジン	約 20. 05
グルタミン酸またはグルタミン	約 17. 51
アスパラギン酸またはアスパラギン	約 10. 75
チロシン	約 7. 13
アラニン	約 3. 49
バリン	約 3. 01
リジン	約 2. 92
ロイシン	約 1. 55
アルギニン	約 1. 44
セリン	約 1. 23

4

【請求項8】 配列表の配列番号：1に記載したアミノ酸配列で示される生理活性蛋白並びにザルコトキシンおよび／又はザーベシンを含有してなる抗真菌剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、双翅目または膜翅目に属する昆虫の幼虫体液中に存在する新規な生理活性蛋白およびその製造法ならびにその用途に関する。

【0002】

【従来の技術】 細菌や異種の血球を、昆虫に接種したり単に体表に傷をつけるといった刺激を与えると体液中に数々の蛋白が誘導されることが知られている。これらの物質は、抗体産生能を持たない動物の生体防御にとって重要な係わりがあるものと考えられる。これらのうちで例えばセンチニクバエ (*Sarcophaga peregrina*) 幼虫体液中に誘導される活性蛋白として、血球凝集作用をもつ蛋白 [J. Biol. Chem., 255巻、2919-2924頁 (1980)]、抗菌活性を持つ蛋白 [Biochem. J., 211巻、727-734頁 (1983)] などが同定されている。

【0003】 前者のレクチン様蛋白は、ザルコファルガ (*Sarcophaga*) レクチンと命名され、マウスの骨髄細胞やマクロファージの真菌殺能を増強させる、ヒトT細胞よりのα-インターフェロンの産生を導く、生体防御等の作用が研究されている。

【0004】 また後者の本発明者が分離精製した抗菌活性を持つ蛋白としては、ザルコトキシン (*Sarcotoxin*) I と命名され、その理化学的性質も明らかにされている (特開昭59-13730) 蛋白、ザルコトキシン II と命名され、その理化学的性質も明らかにされている (特開昭63-35599) 蛋白、および同じくセンチニクバエの幼虫体液から得られ、ザーベシン (*Sapecin*) と命名され、その理化学的性質も明らかにされている (特開昭63-185997) 蛋白等が知られている。これらは幅広い抗菌スペクトルを有することから、生体防御物質と考えられ、更にこれらの抗菌性蛋白は特にグラム陰性菌の大腸菌及びグラム陽性菌の黄色ブドウ状球菌に対して強い抗菌力を有している。

【0005】 一方、近年高等哺乳動物でも、精液中や血清中に、抗菌力が強くて幅広いスペクトルを持つ抗菌性蛋白の存在が明かとなり、一般に動物体液中の抗菌性蛋白が重要視されている。

【0006】 センチニクバエの抗菌性蛋白であるザルコトキシン I については、本発明者らはザルコトキシン I A、I B および I C と命名した三つの物質を既に精製しており、これらは互いに 2~3 アミノ酸残基のみが異なる、いずれも 39 アミノ酸残基からなることを示した [J. Biol. Chem., 260巻、7174-7177頁 (1985)]。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】 しかしながら、従来得られている抗菌性蛋白 (ザルコトキシン I、II 或いはザーベシン) は大腸菌及びその近縁のバクテリアに対して強い抗菌力を示すが真菌類に対してはその作用が認められていない。

【0008】 よって、本発明者はセンチニクバエの他の抗菌性蛋白について精製・分離方法を確立し、物質の性状、アミノ酸配列等の理化学的性状を明らかにした。従って、この蛋白性物質が単一なまでに精製・分離でき、そのアミノ酸配列が決定され、さらにこれら昆虫由来の蛋白がヒトなどの脊椎動物の生体防御機構に働くとなれば、例えば医学・薬学的見地からも寄与するところは大きい。

【0009】

【課題を解決するための手段】 本発明は、双翅目または膜翅目に属する昆虫、とりわけセンチニクバエ幼虫の体液中に誘導される生理活性蛋白である、既に構造決定された蛋白類 (前記) とは別の、誘導されることなく幼虫体液中に存在している蛋白類について、その精製・分離に成功したことに基づくものである。つまり、本発明による新規な生理活性蛋白は真菌類に対して抗菌作用を有する新規な抗真菌性蛋白およびその製造法並びにその利用方法に関する。

【0010】 本発明による抗真菌性蛋白は、双翅目または膜翅目に属する昆虫の幼虫体液中に存在し、下記の性質を有する生理活性蛋白である。

50 (1) 分子量約 13,000

5

## (2) 热安定性 (5~10分間、100℃)

グリシン	グリシン
ヒスチジン	ヒスチジン
グルタミン酸またはグルタミン	グルタミン酸またはグルタミン
アスパラギン酸またはアスパラギン	アスパラギン酸またはアスパラギン
チロシン	チロシン
アラニン	アラニン
バリン	バリン
リジン	リジン
ロイシン	ロイシン
アルギニン	アルギニン
セリン	セリン

6

## (3) アミノ酸組成 (モル%)

約 30.93
約 20.05
約 17.51
約 10.75
約 7.13
約 3.49
約 3.01
約 2.92
約 1.55
約 1.44
約 1.23

【0011】また、本発明による生理活性蛋白の製造法は、双翅目または膜翅目に属する昆虫の幼虫体液より体液細胞および脂肪体を除去したのから上記の性質を有する生理活性蛋白を取得することを特徴とするものである。

【0012】さらにまた、本発明による抗真菌剤は、双翅目または膜翅目に属する昆虫の幼虫体液中に存在し、上記の性質を有する生理活性蛋白を有効成分とするものであり、また、センチニクバエより既に単離精製されているザルコトキシンⅠ及び／又はザーベシンを上記の生理活性蛋白と併用することにより抗真菌活性が増強された抗真菌剤である。

【0013】また、上記の生理活性蛋白は単離精製され、そのアミノ酸配列が決定されている。その配列は配列表の配列番号：1に示される。以下に本発明をより具体的に説明する。

## 【0014】(A) 対象昆虫および体液の取得

本発明で対象とする昆虫は、双翅目または膜翅目に属する昆虫である。具体的には、ハエ、カ、ハチ、アブなどである。これらのうちでは、ニクバエ科のハエ、特にセンチニクバエが好ましい。

【0015】対象昆虫は、幼虫でなければならない。ここで「幼虫」とは、昆虫の完全変態の過程において、蛹化後、蛹化前のものをいう。本発明で適当なものは、三令に同調してある幼虫、特にセンチニクバエ幼虫である。

【0016】生理活性蛋白を得るには、体液をしぶり出し、遠心分離により体液細胞を除き、さらに得られた上清から脂肪体および不要な蛋白を除くため温浴中で加熱（例えば100℃、10分）後、遠心上清をとり、出発材料とする。

【0017】(B) 抗真菌性ポリペプチドの精製・分離  
一般的の高分子蛋白類の分画と精製に常用されるさまざまな方法が適用できる。本発明において、特にセンチニクバエ幼虫を用いる場合、上記で得られた遠心上清を逆相HPLCで分画し、各分画について後に述べる抗真菌活性の測定法に従って有意な活性を示す分画を分取し、更に逆相HPLCを繰り返し单一のピークにまで精製でき

る。

【0018】該遠心画分から本発明の単一な物質まで精製する場合、上記以外にもさまざまな方法が考えられ、例えばイオン交換樹脂処理、吸着クロマトグラフィー、電気泳動などを適宜用いて目的を達することが可能である。

【0019】このようにして得られた抗真菌性物質はトリプシン処理によって失活することから蛋白性物質であることは明らかである。

【0020】本発明による抗真菌性蛋白の抗真菌活性の測定法は、真菌類例えばキャンディダ (Candida) 属に属する微生物を用いて、そのコロニー形成数を指標にして測定できる。

【0021】また前述のように、このバンドの物質が例えばトリプシン処理によって失活することにより、蛋白性物質であることも確認できる。この抗真菌性蛋白は、凍結乾燥を行うと白色粉末として得られる。

## 【0022】(C) 用途

本発明により抗真菌性蛋白は、その抗真菌性を生かして抗真菌剤として有用である。すなわち、それ単独で、あるいは適当な液体、固体または気体の担体ないし希釈剤と組み合わせた形態で、外用或いは内用の抗真菌剤として使用することができる。また、本発明の生理活性蛋白はザルコトキシンⅠおよび／又はザーベシンと併用することによって、その抗真菌活性が著しく増大する。

【0023】特にザルコトキシンⅠの効果は顕著である。ザルコトキシンとは前記に述べたようにセンチニクバエ由来の抗真菌性蛋白であり、本発明者らがザルコトキシンⅠA、ⅠBおよびⅠCと命名した三つの物質のいずれであってもよく、もちろんこれらの混合物であっても良い。

【0024】これらの添加量としては本発明の生理活性蛋白の抗真菌作用を増強させる効果をもたらす量で有れば良く通常本発明の生理活性蛋白に対して0.1%~10%で有れば良い。もちろん他の抗真菌剤等を添加混合しても良い。

【0025】従って、本発明の抗真菌性蛋白は、例えば、細菌性疾患に対する薬剤として使用することができ

る。その場合は、投与の剤型およびその投与量については、患者および疾患の種類、症状などを勘案して、本発明による抗真菌効果が認められる限り任意の選択が可能である。

【0026】本発明の抗真菌性蛋白は蛋白質そのものであるところ、その毒性は少なくとも結果的に経口にて接種されるときには、ほとんどないと考えられる。従って、この抗菌性ポリペプチドは、ヒトおよび動物用の薬剤および食品ないし飼料添加物として利用することができる。例えば、本発明による抗真菌性蛋白は食品添加物としての抗真菌剤、換言すれば可食性抗真菌剤として有用である。

【0027】以下、実施例を記載しながら本発明を詳述する。

【実施例】 (1) 出発材料

センチニクバエ幼虫は、室温中水でぬらしておき、5日以上絶食した三令幼虫を用いた。

【0028】幼虫頭部を切断し、水上、ベトリ皿中にしみ出した体液滴を採取した。通常体液1mlは約100匹の幼虫から得られた。得られた体液を200×Gで5分間の遠心分離に付して血球成分を除き、澄明な上清を-20℃で保存した。

【0029】 (2) 体液の遠心上清

約10000匹の幼虫から採取した体液(40~50ml)を緩衝液A(10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6.0)で5倍に希釈した。その後、100℃で10分間加熱処理後、40,000×g/10分間の遠心分離に付して変性蛋白質を除去し、得られた上清をメンブランフィルター(UF disc type A, Spectrum)を用いた限外ろ過で濃縮した。

【0030】 (3) 抗真菌活性の測定

検定菌としてキャンディダ・アルビカンス(Candida albicans) ATCC 36232を使用した。検定菌を1×10<sup>5</sup> cells/mlとなるように水に懸濁し、その90μlに被検液10μlを混合して37℃で24時間放置する。その後この液10μlをサブロー寒天培地を用いて37℃で一昼夜培養し、コロニー数を計測する。

【0031】 (4) 逆相HPLCによる分画・精製

(2) 得られた遠心画分をギルソンのシステムにつなぎ逆相カラム〔シンクロパック(Synchropak) RP-P, C-18 250×4.1mm〕の高速液体クロマトグラフィー(HPLC)に流した。そし

て、0.05%トリフルオロ酢酸を含んだアセトニトリルの濃度勾配により、吸着画分を溶出させた。各画分は凍結乾燥した後に緩衝液にとかし、(3)に従ってその抗真菌活性を測定した。活性が認められた画分につき更にHPLCを繰り返した。

【0032】得られた画分の凍結乾燥の一部を、2% (v/v) β-メルカプロエタノール含有1% (w/v) SDS(ドデシル硫酸ナトリウム)溶液に溶解し、100℃、5分間加熱処理後、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけた。ゲルのアクリルアミド含量は12.5%であった。泳動後、ゲルをクマシブリリアンブルーR-250で染色したところ、分子量約13,000の単一蛋白バンドを与えた。

【0033】指標タンパクとしてはオバルブミン(45,000)、α-キモトリプシンオーゲン(25,000)、リゾチーム(14,000)およびチトクロムC(12,000)を用いた。

【0034】蛋白量はローリーの方法[J. Bioc hem., 193巻, 265頁(1951)]を修正して行った。即ち、適量の試料(5~20μg)に緩衝液(緩衝液Aに130mMのNaClを含有)を加え、最終的に緩衝液の半量の塩濃度にし、その200μlに対し10%トリクロロ酢酸200μlを加え、70℃で20分間加熱したのち、氷中に30分間以上放置する。

【0035】3000 rpm(15分間、4℃)の遠心により沈殿をとり、ローリー法用の溶液C 200μlおよび蒸留水200μlを加え、10分間室温放置後、フェノール試薬20μlを加え、37℃で40分間加熱後、700nmの吸光度を測定した。スタンダードとして牛血清アルブミンを用いた。

【0036】(5) アミノ酸組成の測定

得られた抗真菌性蛋白のアミノ酸組成を日立835型アミノ酸分析計、高分離法によって分析した。表1に示すように、11種類のアミノ酸よりなる蛋白であり、グリシンとヒスチジンがモル比でそれぞれ30%及び20%を占める偏ったアミノ酸組成を持つことが判った。なお、ここでアミノ酸残基数は、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動での主要蛋白の分子量を基準に計算した。

【0037】

【表1】

アミノ酸	モル(%)	アミノ酸残基数
グリシン	30.93	21
ヒステジン	20.05	14
グルタミン酸+グルタミン	17.51	11
アスパラギン酸+アスパラギン	10.75	7
チロシン	7.13	5
アラニン	3.49	2
バリン	3.01	2
リジン	2.92	2
ロイシン	1.56	1
アルギニン	1.44	1
セリン	1.23	1
計	100.0	67

## 【0038】(6)アミノ酸配列の推定

センチニクバエ幼虫(100匹)の組織をグアニジニウムチオシアネートにより処理して全RNA(10mg)を抽出し、0.5M-NaClを含有する10mMトリス-塩酸緩衝液(pH7.5)を結合緩衝液としてオリゴdTセルロースに結合させ、次にNaClを含有しない緩衝液で溶出させることによりpoly(A)RNAを200μg得た。

【0039】Okayama-Bergの方法[Mo1. Cell. Biol. 2巻、161-170頁(1982)]に従って約30μgの上記poly(A)RNAと3μgのベクタプライマDNAとを用いてcDNAを作成し、モリゾン等の方法[Method in Enzymol. 68巻、326-331頁(1979)]に従って大腸菌(HB101株)の形質転換を行った。

【0040】50μg/mlのアンビシリンを含有するLB-寒天培地を用いて形質転換細胞をスクリーニングしたところアンビシリン耐性を示す形質転換細胞が約5万個得られた。

【0041】(4)で精製された本発明の生理活性蛋白をバイオグルタメイト・アミノペプチダーゼ処理した後、エドマン分解し、PTH-アミノ酸を分析したところ、N末端のアミノ酸配列(配列番号:2)20個が決定された。また、本発明の生理活性蛋白をTPCK-トリプシンで限定分解して得られた断片のアミノ酸配列(配列番号:4)を決定した。

【0042】決定されたアミノ酸配列(配列番号:2及び配列番号:4)に相当するmRNAと相補的な配列(配列番号:3及び配列番号:5)に示されるイノシンを含む20個及び23個のデオキシリボヌクレオチドからなる32種及び16種のオリゴデオキシリボヌクレオチドを合成した。これらの合成にはβ-シアノエチルフルオスファアミダイド法[Nucleic Acid Research, 16巻、257-260頁(1995)]

4)に従ってファルマシア社製のDNA合成装置を用いて行った。

【0043】クローニングは[Gene, 10巻、63-67頁(1980)]の方法に従った。すなわち、上記で得られたアンビシリン耐性を示す形質転換株をニトロセルロース膜にレプリカし、50μg/mlのアンビシリンを含有する寒天プレート上で3-4時間培養した後、更に500μg/mlのクロラムフェニコールを含有するLB-寒天培地に移し、37℃で一昼夜培養した。フィルター上に生じたコロニーを0.5N-水酸化ナトリウムで溶菌し、二本鎖DNAを一本鎖DNAとした。

【0044】次いで中和してpH7.5とする。次いで1.5M-NaClを含有するトリス-塩酸緩衝液(pH7.5)に上記のフィルターを5分間浸漬して菌体の残渣を除いた。その後、フィルターを乾燥し、80℃で2時間ペーリングし、プレートに固定してスクリーニング用の被検フィルターとした。

【0045】形質転換株のスクリーニングはグルテンシユタイン等の方法[Proc. Natl. Sci. USA, 72巻、3961-3965頁(1975)]に従った。即ち、配列番号:3及び配列番号:5の各オリゴデオキシリボヌクレオチドの5'末端に[γ-<sup>32</sup>P]ATPを用いポリヌクレオチドキナーゼでラベルしてスクリーニング用のプローブとした。

【0046】上記の被検フィルター上の形質転換株を配列番号:3で示される群の標識オリゴデオキシリボヌクレオチドをプローブとして50℃でのハイブリダイゼーションによりスクリーニングし、配列番号:5で示される群の標識オリゴデオキシリボヌクレオチドをプローブとして50℃でのハイブリダイゼーションによるスクリーニングしたところ、両群のオリゴデオキシリボヌクレオチドにハイブリダイズする形質転換株20株を得た。

【0047】生理活性蛋白をコードするcDNAの塩基配列の決定は生理活性蛋白クローニングを制限酵素により切

11

断した断片をM13ファージベクターを用いたダイオキシ法 [Anal. Biochem., 152卷, 232-238頁 (1986)] に従ってサブクローニングして行った。

【0048】配列番号: 6に、このようにして決定された生理活性蛋白含有クローンの塩基配列 (cDNAと相補的配列) 及び生理活性蛋白の塩基配列にから推定されるアミノ酸配列を示す。 (4) で得られた精製された生理活性蛋白のN末端の配列より67個のアミノ酸残基数と (5) で計算したアミノ酸残基数とよく一致している。

【0049】(7) 抗真菌性蛋白濃度と抗真菌活性の測定

(2) で得られた精製された抗真菌性蛋白を用いて測定した。なお、(3) の抗真菌活性の測定において被検液10μl中の蛋白量を0~100μg/mlと変化させて測定した。その結果を図1に示す。この結果より、本発明の生理活性蛋白の抗真菌活性は真菌細胞を蒸留水中で処理することによって強く認められた。

\*

12

\* 【0050】(8) 抗真菌性蛋白とその他の抗真菌性蛋白との相乗効果

本発明の抗真菌性蛋白と同じくセンチニクバエ体液より既に単離精製されているサルコトキシンおよびザーベシンの存在下での抗真菌活性を測定した。

【0051】(3) と同様に検定菌としてはキャンディダ・アルビカンス (Candida albicans) ATCC36232を使用した。検定菌を1.1×10<sup>5</sup>cells/mlとなるようにサブローブロスに懸濁し、その90μlにザルコトキシンIA (10μg/ml) 或いはザーベシン (10μg/ml) 及び本発明の抗真菌性蛋白を各種組み合わせて添加混合して37℃で2時間及び6時間放置する (最終液量は102.25μl)。その後、この液10μlをサブロー寒天培地を用いて37℃で一昼夜培養し、コロニー数を計測する。この結果を表2及び図2に示す。

【0052】

【表2】

実験番号	抗真菌性蛋白の添加の有無			コロニー形成数(個)
	本発明の生理活性蛋白	サルコトキシン	ザーベシン	
1	-	-	-	3400±50
2	○	-	-	2850±150
3	○	○	-	800±10
4	○	-	○	2750±10
5	○	○	○	500±100
6	-	○	○	3900±100
7	-	○	-	3900±200
8	-	-	○	4050±50

【0053】表2及び図2より本発明の抗真菌性蛋白の抗真菌力はザルコトキシンIの存在下で著しく活性化され、ザーベシンの存在下でも僅かであるが活性化されることが判った。なお、ザルコトキシンI及びザーベシンの単独使用或いはこれらの混合物を用いたときには抗真菌作用はみられなかった。

【0054】以上の結果よりセンチニクバエは、単独では抗真菌作用を示さない抗細菌性蛋白と本発明の生理活性蛋白を組み合わせることによって効率的な真菌防御機構を構築しているものと考えられる。

【0055】

【発明の効果】本発明による抗真菌性蛋白はそれ自体抗※

※菌性を有し、しかも毒性はほとんどない。従ってこの性質を利用できる種々の用途が考えられるが、特にこれらの物質を有効成分とする医薬品製剤としての応用、あるいは食品添加物としての利用が期待できる。

【配列表】

【0056】配列番号: 1

配列の長さ: 67

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: Genomic DNA  
配列

Gln His Gly His Gly Gly Gln Asp Gln His Gly Tyr Gly His Gly	15
Gln Gln Ala Val Tyr Gly Lys Gly His Glu Gly His Gly Val Asn	30
Asn Leu Gly Gln Asp Gly His Gly Gln His Gly Tyr Ala His Gly	45
His Ser Asp Gln His Gly His Gly Gly Gln His Gly Gln His Asp	60
Gly Tyr Lys Asn Arg Gly Tyr	67

【0057】配列番号: 2

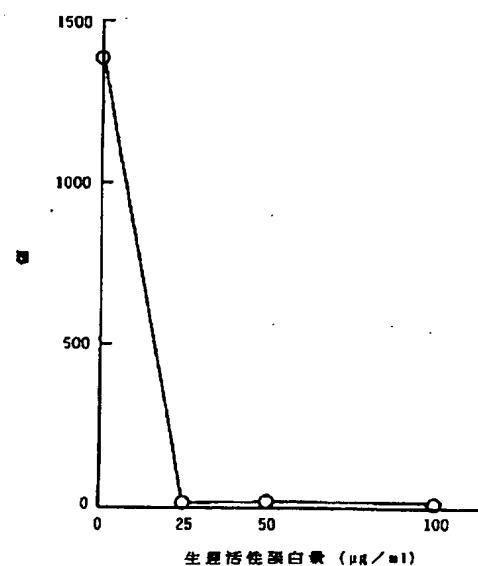
配列の長さ: 20

配列の型: アミノ酸

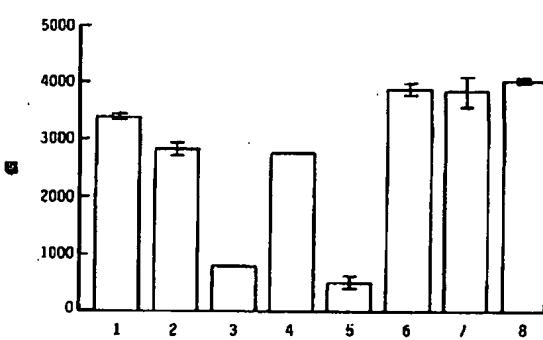
50 トポロジー: 直鎖状



【図1】



【図2】



フロントページの続き

(51) Int.Cl.<sup>5</sup>

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

C 0 7 K 7/10

8318-4H

// C 1 2 N 15/12

C 0 7 K 99:00